PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : G01N 27/447

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/64850**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 16. Dezember 1999 (16.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03834

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Juni 1999 (02.06.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 26 020.2 10. Juni 1998 (10.06.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: HELLER, Christoph [DE/DE]; Schlangenbacher Strasse 34, D-14197 Berlin (DE). EICKHOFF, Holger [DE/DE]; Lützelsteiner Weg 50, D-14195 Berlin (DE). BEHR, Sven [DE/DE]; Ernst-Bruch-Zeile 22, D-13591 Berlin (DE).

(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Brienner Strasse 52, D-80333 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR MINIATURIZED, HIGHLY PARALLEL ELECTROPHORETIC SEPARATION

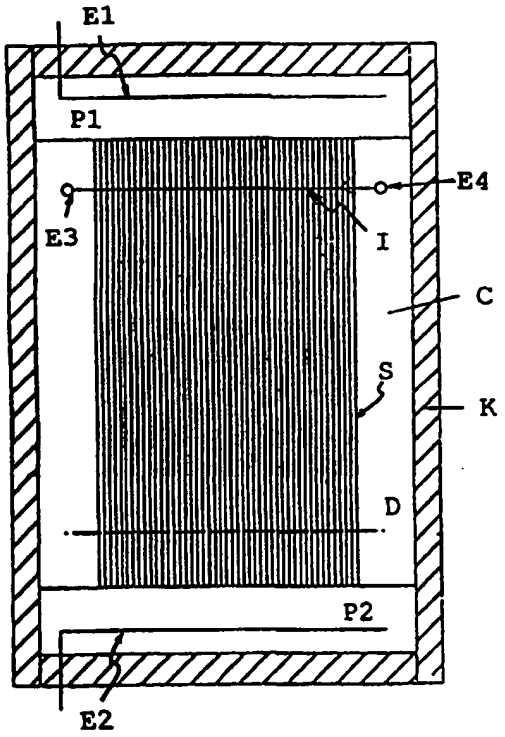
(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR MINIATURISIERTEN, HOCHPARALLELEN ELEKTROPHORETISCHEN TRENNUNG

(57) Abstract

In an electrophoresis device comprising a plurality of separation channels (S) that can be separately loaded with samples, said samples are charged by depositing the samples in a common injection channel (I) that splits the separation channels (S) in the vicinity of a point of intersection between the injection channel (I) and one of the separation channels (S). The samples are transferred into the separation channels (S) by a tension applied in the injection channel (I) and electrophoretically separated in the separation channels.

(57) Zusammenfassung

Bei einer Elektrophoresevorrichtung mit einer Vielzahl separat mit Proben beschickbaren Trennkanälen (S) erfolgt die Probenbeschickung durch Probenauftrag in einen gemeinsamen, die Trennkanäle (S) schneidenden Injektionskanal (I) jeweils in der Nähe eines Kreuzungspunktes des Injektionskanals (I) mit einem der Trennkanäle (S). Unter Wirkung einer Spannung im Injektionskanal (I) werden die Proben in die Trennkanäle (S) überführt und dort elektrophoretisch getrennt.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Vorrichtung und Verfahren zur miniaturisierten, hochparallelen elektrophoretischen Trennung

Die Erfindung betrifft eine Elektrophoresevorrichtung mit einer Vielzahl von separat mit Proben beschickbaren Trennkanälen, insbesondere eine Elektrophoresevorrichtung, die als Mikrosystem in Chipform hergestellt ist, und ein Elektrophoreseverfahren unter Verwendung einer derartigen Vorrichtung.

Die elektrophoretische Trennung von Substanzen und Substanzgemischen ist ein analytisches Verfahren, das insbesondere in der Biochemie und Molekularbiologie weit verbreitet ist. Die zu trennenden Substanzen werden unter Wirkung eines elektrischen Feldes in einem Trennmedium getrennt und separat detektiert. Insbesondere zur Analyse komplexer Genome und Proteome ist es erforderlich, eine sehr große Anzahl verschiedener Proben (Größenordnung rd. 10^5 bis 10^7) zu analysieren. Daher besteht ein Interesse an möglichst automatisch arbeitenden Analysesystemen mit hohem Probendurchsatz.

Gegenüber den herkömmlichen Elektrophoreseverfahren wurden mit der seit rd. 10 Jahren allgemein bekannten Kapillarelektrophorese die Trenngeschwindigkeit, die Empfindlichkeit und die Möglichkeit zur Automatisierung verbessert bzw. vereinfacht. Bei der Kapillarelektrophorese befindet sich das Trennmedium in einer Kapillare, die von einem Probenreservoir zu einer Auffangvorrichtung führt. Obwohl die Verwendung von Kapillaren den Vorteil einer relativ einfachen Anpassung der Kapillaranordnung in Bezug auf bestimmte Probenreservoire besitzt, führt die weitere Entwicklung unter Verwendung der

Mikrosystemtechnik zu der seit rd. 5 Jahren allgemein bekannten Miniaturisierung der Kapillarelektrophorese.

Bei der miniaturisierten Kapillarelektrophorese befindet sich das Trennmedium in Mikrokanälen, die als Strukturen in Festkörper-Trägermaterialien z.B. aus Silizium oder auch aus Kunststoffen prozessiert sind. Diese Elektrophoresevorrichtungen in Chipform besitzen zwar die Vorteile einer hohen Trenngeschwindigkeit, einer zur Erzielung vergleichbarer Trennfeldstärken erforderlichen niedrigeren Spannung und einer kostengünstigen Herstellung in großer Stückzahl als Einwegprodukt, ergeben aber auch Nachteile bei der Probenbeschickung oder Probeninjektion in die Trennkanäle. So ist es erforderlich, daß die Injektion in Bezug auf den Injektionsort und das Injektionsvolumen möglichst genau und reproduzierbar erfolgt.

Aus den Publikationen von A.T. Woolley et al. in "Anal. Chem.", Bd. 67, 1995, S. 3676 ff., und in "Anal. Chem.", 1997, Bd. 69, S. 2181 ff., sind Elektrophoresechips mit Kanalstrukturen bekannt, die im folgenden unter Bezug auf die Figuren 3 und 4 erläutert werden. Die Grundstruktur herkömmlicher, miniaturisierter Elektrophoresevorrichtungen besteht in sich kreuzenden Kanälen zur Injektion bzw. zur Trennung. Gemäß Figur 3 ist ein Injektionskanal zwischen den Reservoiren 1 und 3 und ein Trennkanal zwischen den Reservoiren 2 und 4 vorgesehen. Während der Trennung wird zunächst der Injektionskanal mittels einer entsprechenden Elektrodeneinrichtung mit einer Spannung beaufschlagt, um die zu trennende Probe (schwarz gefüllt) in den Kreuzungsbereich zu transportieren. Anschließend erfolgt die Trennung im Trennkanal (schraffiert). Die genannte Kreuzstruktur besitzt die folgenden Nachteile.

Die Reservoirs und Elektrodeneinrichtungen nehmen viel Platz ein, wodurch die Zahl der Elektrophorese-Trennkanäle auf dem Chip beschränkt ist. Durch die ungünstige Geometrie liegen die

Kanäle relativ weit voneinander entfernt, was nachteilig für die Detektion ist. Erfolgt beispielsweise eine Fluoreszenzdetektion der getrennten Substanzen, müssen ungünstige Abbildungsmaßstäbe gewählt oder von einer Scan-Einrichtung große Bereiche abgetastet werden. Dem kann zwar durch Bereitstellung gekrümmter Kanäle begegnet werden, wodurch sich jedoch weitere Nachteile bei der Herstellung und auch der Trennleistung ergeben. Der Parallelisierungsgrad (Zahl der simultan ablaufenden Trennvorgänge) ist beschränkt.

Ein weiterer Nachteil besteht in der hohen Anzahl von Reservoirs und Elektrodeneinrichtungen. Für n Kanäle werden 4n Reservoirs und Elektroden benötigt. Dies ist mit einem hohen Platzaufwand und wegen der separaten Ansteuerung auch mit einem hohen Schaltungsaufwand verbunden. Durch kombinierte Verwendung der Anoden und Kathoden einzelner Kanäle konnte bislang maximal eine Reduktion auf 2n+2 Elektroden erreicht werden.

Auch die herkömmliche Chipgestaltung gemäß Fig. 4 (A.T. Woolley et al. in "Anal. Chem." 1997, Bd. 69, S. 2181 ff., erlaubt nur eine geringfügig verbesserte Platzausnutzung. Die Trennkanäle sind aufgefächert und werden an jedem Ende von einem gesonderten Probenkanal P gekreuzt. Diese Anordnung ist auf rd. 12 Kanäle auf einem Chip der Größe
50 * 75 mm beschränkt.

Ein grundsätzlicher Nachteil herkömmlicher, miniaturisierter Elektrophoresevorrichtungen besteht darin, daß generell der Probenauftrag wegen des Fehlens einer angepaßten Schnittstelle zwischen den Mikrokanälen und der makroskopischen Welt mit einem übermäßigen Probenverbrauch verbunden ist. So müssen die Probenreservoire mit relativ großen Volumina befüllt werden, wie dies beispielsweise von S.C. Effenhauser et al. in "Elektrophoresis", 1997, Bd. 18, S. 2203 ff., beschrieben ist. Da

von den Probenreservoiren nur rd. 1% des Volumens in den jeweiligen Trennkanal injiziert wird, ergibt sich ein unakzeptabler Probenverbrauch.

Aufgrund der genannten Nachteile ist der Einsatz miniaturisierter Elektrophoresevorrichtungen bisher nur eingeschränkt möglich.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine verbesserte Elektrophoresevorrichtung anzugeben, bei der eine vergrößerte Zahl von Trennkanälen auf einem Chip angebracht werden kann. Die verbesserte Elektrophoresevorrichtung soll insbesondere eine vereinfachte Geometrie und verbesserte Trenn- und Detektionseigenschaften besitzen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein Verfahren zur Verwendung einer derartigen Elektrophoresevorrichtung anzugeben, mit dem insbesondere der Probenauftrag in die Elektrophoresevorrichtung vereinfacht und der Probenverbrauch verringert wird.

Diese Aufgabe wird durch eine Elektrophoresevorrichtung und ein Trennverfahren mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 9 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Aufgabe der Erfindung wird insbesondere durch eine neue Kanalgeometrie gelöst, bei der die von den herkömmlichen Kreuzstrukturen an sich bekannten Quer- oder Probenkanäle jedes Trennkanals zu einem gemeinsamen Injektionskanal verbunden werden, der jeden Trennkanal kreuzt. Der Injektionskanal ist mit einer Elektrodeneinrichtung versehen, die lediglich zwei Elektroden an seinen Enden aufweist. In unmittelbarer Nähe jedes Kreuzungspunktes zwischen dem Injektionskanal und den Trennkanälen besitzt der Injektionskanal jeweils einen Auftragsbereich, in dem die Probenbeschickung erfolgt. Auf der dem Auftragsbereich gegenüberliegenden Seite jedes Kreuzungs-

punktes, an dem der Injektions- und der Trennkanal miteinander in Verbindung stehen, besitzt der Injektionskanal gegebenenfalls eine Probenbarriere, um eine Kontamination des nächstfolgenden Auftragsbereichs des benachbarten Trennkanals zu verhindern.

Gemäß einem besonderen Aspekt der Erfindung verlaufen die Trennkanäle durchgehend von einem bis zum anderen Ende des Trägerchips. Dies ermöglicht den Einsatz des Trägerchips in eine wiederverwendbare Elektrophoresekammer mit Pufferreservoiren und einer Elektrodeneinrichtung zur Erzeugung der Trennfeldstärke. Die Trennkanäle sind an den Chipenden offen, so daß durch einfache Einbringung des Trägerchips in die Elektrophoresekammer der Kontakt mit den Pufferreservoiren hergestellt werden kann.

Ein weiterer, besonders wichtiger Aspekt der Erfindung besteht in der Kombination einer Elektrophoresevorrichtung mit einer Probenbeschickungseinrichtung in Form eines Mikrodispensers. Dieser besteht aus einem oder mehreren Elementen (Pipetten, Kapillaren, Metallstifte), die entweder aktiv oder passiv Flüssigkeiten aufnehmen und abgeben können. Mit dem Mikrodispenser können in vorbestimmter Weise kleinste Probenvolumina (z.B. 100 pl) jeweils in bestimmte Auftragsbereiche des Injektionskanals eingebracht werden. Für elektrisch geladene Moleküle (Ionen) kann der Mikrodispenser aus dünnen Stahlstiften bestehen, die elektrisch aufgeladen werden können. Durch entspechendes Anlegen und anschließendes Umpolen eines elektrischen Feldes können die Moleküle aufgenommen und wieder abgegeben werden. Bei einem erfindungsgemäßen Trennverfahren erfolgt somit die Probenbeschickung mit einem Mikrodispenser, der mindestens ein Element (Dispensierpipette, Kapillare oder Stahlstift) besitzt.

Die Moleküle (Ionen) können zusätzlich nach dem Auftragen an speziellen, elektrisch aufladbaren Zonen ("Elektroden") am Anfang des Trennkanals aufkonzentriert ("fokussiert") werden. Nach Auftragung in die Auftragszone wird an die möglichst schmalen (z.B. 50 µm) Zonen ein elektrisches Feld angelegt. Die Moleküle wandern zu diesem Bereich und werden dort festgehalten, wodurch eine Aufkonzentrierung der Probe erfolgt. Danach erfolgt die eigentliche Trennung.

Mit der Erfindung werden die folgenden Vorteile erzielt. Die neue Kanalgeometrie erlaubt eine erhöhte Anordnungsdichte der Trennkanäle. So lassen sich beispielsweise rd. 10-fach mehr Trennkanäle pro Chipfläche anordnen, als dies bei herkömmlichen Elektrophoresevorrichtungen möglich ist. Dies erhöht den Parallelisierungsgrad der Analyse erheblich. Ferner wird die Detektion erleichtert und aufgrund der geringen Dimensionen und des günstigeren Abbildungsmaßstabs verbessert. Es ist möglich, sämtliche Trennkanäle gerade auszuführen. Dies erleichtert die Herstellung der Elektrophoresevorrichtung und verbessert die Trenneigenschaften, da die Wanderungseigenschaften der Probe in geraden Kanälen besser kontrolliert werden können. Die Zahl der erforderlichen Elektroden wird auf vier Elektroden (jeweils zwei Elektroden für den Injektionskanal und die Trennkanäle) reduziert. Diese Reduktion ist unabhängig von der Zahl der Trennkanäle. Damit wird ein erheblicher Platzgewinn und eine Vereinfachung der Ansteuerschaltung erzielt.

Die Herstellung der Mikrostrukturen wird erheblich vereinfacht, da die Prozessierung separater Querkanäle unterbleiben kann. Der verbleibende Einbau von zwei Elektroden für den Injektionskanal verringert das Problem der Verbindung von metallischen Elektrodenwerkstoffen und Chip-Kunststoffen, so daß die Kosten zur Chipherstellung verringert werden.

Durch die erfindungsgemäße Probenbeschickung kann die Probenmenge reduziert werden. Bei einer erfindungsgemäßen Elektrophoresevorrichtung müssen gegenüber herkömmlichen Anordnungen lediglich 10 bis 30% des Probenvolumens injiziert werden.

Weitere Vorteile und Eigenschaften der Erfindung sind aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Draufsicht auf eine erfindungsgemäße Elektrophoresevorrichtung in einer Elektrophoresekammer,

Fig. 2 eine vergrößerte Draufsicht auf die Kreuzung des Injektionskanals mit zwei Trennkanälen,

Fig. 3 eine schematische Darstellung einer herkömmlichen Elektrophoresevorrichtung (Stand der Technik), und

Fig. 4 eine weitere Darstellung einer herkömmlichen Elektro phoresevorrichtung (Stand der Technik).

Die Erfindung wird im folgenden unter Bezug auf eine bevorzugte Ausführungsform beschrieben, bei der ein Trägerchip mit der erfindungsgemäßen Kanalstruktur als separates Teil in einer Elektrophoresekammer vorgesehen ist. Die Erfindung ist jedoch auch mit einer einstückigen Gestalt implementierbar, bei der der Trägerchip fester Teil der Elektrophoresekammer ist.

Die erfindungsgemäße Elektrophoresevorrichtung umfaßt gemäß Fig. 1 eine Vielzahl von Trennkanälen S, die sich von einem ersten Pufferreservoir P1 mit einer ersten Elektrode E1 zu einem zweiten Pufferreservoir P2 mit einer zweiten Elektroden E2 erstrecken. Die Elektroden E1, E2 werden mit einer Spannung (Trennspannung) beaufschlagt, die zur Ausbildung einer elektrischen Feldstärke in den Trennkanälen S eingerichtet ist,

unter deren Wirkung die Proben mit substanzspezifischen Wanderungsgeschwindigkeiten durch die Trennkanäle wandern. Die Trennkanäle S verlaufen gerade in einem Trägerchip C zwischen den jeweils angrenzenden Pufferreservoiren P1, P2.

Nahe dem einen Ende der Trennkanäle S werden diese vom Injektionskanal I gekreuzt. Der Injektionskanal I ist ebenfalls auf der Oberfläche des Trägerchips C prozessiert, verläuft jedoch schräg oder quer zu den Trennkanälen. Zur Vereinfachung der Ansteuerung und Vereinheitlichung der Trennstrecken ist der Injektionskanal auch gerade und verläuft im wesentlichen senkrecht zur Ausrichtung der Trennkanäle. An den Enden des Injektionskanals I, d.h. beidseitig des von den Trennkanälen S durchsetzten Bereiches sind Elektroden E3, E4 vorgesehen. Die Elektroden E3, E4 werden mit einer Spannung zur Ausbildung einer Feldstärke im Injektionskanal I beaufschlagt, unter deren Wirkung die Probeninjektion jeweils von einem Auftragsbereich in einen der Trennkanäle erfolgt (Injektionsspannung). Die Injektionsspannung ist eine Gleichspannung geeignet gewählter Polarität. Zusätzlich können nach der Injektion die Moleküle an speziellen Zonen durch die Wirkung eines elektrischen Feldes aufkonzentriert werden. Am entgegengesetzten Ende der Trennkanäle S ist eine Detektionszone D vorgesehen. In der Detektionszone D werden die in den Trennkanälen aufgrund ihrer verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten getrennten Substanzen detektiert. Die Detektion erfolgt in an sich bekannter Weise z.B. durch Fluoreszenz-Messungen o.ä.

Bei der dargestellten Ausführungsform sind die Trennkanäle S rd. 5 cm lang. Die Breite der Trennkanäle kann z.B. im Bereich von einigen 100 µm bis rd. 20 µm liegen. Diese Größen sind jedoch je nach Anwendungsfall veränderlich. Die Trennspannung zwischen den Elektroden E1, E2 und die Injektionsspannung zwischen den Elektroden E3, E4 wird in Abhängigkeit von den gewünschten elektrischen Parametern, den Größenverhältnissen und

den elektrischen Eigenschaften des Trennmediums ausgewählt, wie dies an sich von den herkömmlichen Elektrophoresevorrichtungen mit Kreuzstruktur bekannt ist. Allerdings ist die Injektionsspannung gegenüber der Injektionsspannung an einer einzelnen Kreuzstruktur gemäß Fig. 1 entsprechend der Zahl der Trennkanäle S multiplikativ erhöht, um an jeweils einem Kreuzungspunkt zwischen dem Injektionskanal I und einem Trennkanal S unter Berücksichtigung des Spannungsabfalls an den übrigen Teilen des Injektionskanals I eine genügend hohe Injektionsteilspannung auszubilden.

Der Trägerchip C besitzt eine Abdeckung (nicht dargestellt) der Trennkanäle S, die jedoch den Injektionskanal I oder die Auftragsbereiche A (s. unten) von diesem frei läßt. Die Abdekkung z.B. in Form einer Folie (oder auch einer Flüssigkeit mit geringerer Dichte) dient der Vermeidung von Verunreinigungen und der Ausbildung reproduzierbarer Eigenschaften der Trennstrecken entlang der Trennkanäle S.

Der Trägerchip C ist in die Elektrophoresekammer A zwischen den Pufferreservoiren P1, P2 einsetzbar. Zur genauen Positionierung des Trägerchips C können (nicht dargestellte) Halteeinrichtungen an der Elektrophoresekammer K vorgesehen sein.

Fig. 2 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Oberfläche des Trägerchips C mit zwei Trennkanälen S und dem Injektionskanal I. Die schematische Darstellung gemäß Fig. 2 zeigt die Trennkanäle mit einer größeren Breite als den Injektionskanal. Je nach Anwendungsfall können diese Verhältnisse umgekehrt sein. Die Breite des Injektionskanals kann insbesondere anwendungsabhängig in Bezug auf eine gewünschte Auflösung der Trennung gewählt werden. Da nach der Trennung der Bereich, auf den eine aufgetrennte Substanz verteilt ist (sogenannte Bande oder Peak), nicht schmaler als der Injektionskanal werden kann, sollte bei hoch auflösenden elektrophoretischen Trennungen der

Injektionskanal genügend schmal gewählt werden. In der Nähe jedes Kreuzungspunktes besitzt der Injektionskanal I jeweils einen Auftragsbereich A, der zur Probenbeschickung vorgesehen ist. Wiederum kann der Auftragsbereich A anwendungsabhängig eine gegenüber dem Injektionskanal I vergrößerte Fläche besitzen. Eine derartige Kanalerweiterung (z.B. in Trichterform) besitzt Vorteile bei der Treffsicherheit der Probenbeschickung mit einem Mikrodispenser. Die Position des Auftragsbereichs A in Bezug auf den benachbarten Trennkanal S bzw. die Polarität der an den Elektroden E3, E4 (s. Fig. 1) angelegten Injektionsspannung wird derart ausgewählt, daß unter elektrischer Feldeinwirkung eine im Auftragsbereich positionierte Probe in den benachbarten Trennkanal S wandert.

Fig. 2 zeigt auf der dem Auftragsbereich A entgegengesetzten Seite der Kreuzungspunkte jeweils eine Probenbarriere z.B. in Form einer Molekülfalle M. Die Probenbarriere kann durch eine Kanalverbreiterung, eine semipermeable Membran (z.B. Dialysemembran), die die Pufferionen durchläßt, die Probenmoleküle jedoch zurückhält, oder durch eine dreidimensionale, poröse Struktur (z.B. ein Gel) gebildet werden, das ebenfalls für die Pufferionen durchlässig, für biologische Makromoleküle hingegen undurchlässig oder behindernd ist. Im Falle der Kanalerweiterung beruht die Barrierewirkung auf der lokalen Verringerung der Dichte der elektrischen Feldlinien, wodurch in diesem Bereich Probenmoleküle eine erhebliche Verlangsamung erfahren, so daß für die Dauer der Trennzeit entlang der Trennkanäle S Probenmoleküle nicht den Auftragsbereich A des nächsten Trennkanals S erreichen können.

Die Anbringung einer Probenbarriere oder Molekülfalle M ist nicht zwingend erforderlich. Es ist alternativ möglich, die geometrischen und elektrischen Eigenschaften der Elektrophoresevorrichtung derart auszuwählen, daß die Wanderung von Proben

im Injektionskanal während der Injektionsphase nicht über den jeweiligen Kreuzungsbereich hinaus erfolgt.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Elektrophoresevorrichtung erfolgt entsprechend den als nächstes beschriebenen Schritten.

Ein Trägerchip C wird zum Trennablauf vorbereitet, indem er mit dem Trennmedium beschickt und abgedeckt wird. Die Abdekkung kann mit einer Folie erfolgen, die den Injektionskanal bei den Auftragsbereichen A offen läßt. Der vorbereitete Trägerchip C wird in die Elektrophoresekammer A eingesetzt. Dieses Einsetzen kann automatisiert z.B. mit einer Stelleinrichtung (Roboter) erfolgen. Das Einsetzen des Trägerchips C ist vergleichbar mit dem Einsetzen eines zweidimensionalen Trenngels in eine entsprechende Elektrophoresevorrichtung bei der Gelelektrophorese. Anschließend wird die Elektrophoresekammer mit Pufferlösung befüllt. Das Befüllen erfolgt derart, daß die Pufferreservoire P1, P2 mit der Pufferlösung gefüllt sind, so daß die Enden der Trennkanäle S bedeckt sind. Somit besteht eine Verbindung zwischen der Pufferlösung in den Pufferreservoiren P1, P2 und dem Trennmedium in den Kanälen. Die Befüllung erfolgt derart, daß die Oberfläche des Trägerchips C mit der (nicht dargestellten) Abdeckfolie nicht bedeckt wird. Hierzu können gegebenenfalls an den Längsseiten des Trägerchips C hin zu den Pufferreservoiren geeignete Barrieren vorgesehen sein. Anschließend erfolgt die Beschickung der Auftragsbereiche mit einem Mikrodispenser.

Der Mikrodispenser umfaßt ein oder mehrere Elemente (Kapillaren, Metallstifte, Mikropipetten, Mikrotropfenschußeinrichtungen z.B. mit piezoelektrischer Auslösung).Vorzugsweise wird ein Mikrodispenser mit einer programmierbaren Schrittweite im µm-Bereich verwendet, um eine definierte Probenbeschickung in die Auftragsbereiche A vornehmen zu können. Die Auftragsbereiche A können simultan mit einer Reihe von Mikrodispensern

(entsprechend der Anzahl der Trennkanäle S) oder seriell mit einzelnen Mikrodispensern beschickt werden.

Nach Beschickung der Auftragsbereiche mit Analyten (Probengemische) wandern diese gleichzeitig unter Wirkung des elektrischen Feldes zwischen den Elektroden E3, E4 hin zum benachbarten Trennkanal S und füllen den jeweiligen Kreuzungsbereich. Nach Beendigung dieser Injektionsphase wird das Feld zwischen den Elektroden E3, E4 abgeschaltet. Die Analyten können nun noch zusätzlich durch sich am Anfang des Trennkanals befindliche elektrische aufladbare Zonen aufkonzentriert werden. Danach wird ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden E1, E2 gebildet. Unter Wirkung dieses Feldes werden die Analyten in Richtung Detektionszone D transportiert und durch die Bewegung in der Trennmatrix (Gel, Polymerlösung) getrennt. In Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Komponenten oder Bestandteile der Probengemische erreichen diese zeitlich versetzt die Detektionszone D, wo sie einzeln identifiziert werden können. Es kann vorgesehen sein, daß während der Trennphase ein vorbestimmtes, geringes elektrisches Feld zwischen den Elektroden E3, E4 gebildet ist, um im Trennkanal S ein homogenes Feld aufrechtzuerhalten.

Der Trennablauf kann somit drei Phasen besitzen:

Erste Phase: Beschickung aller oder einer Vielzahl der Auftragsbereiche mit einer Mikrodispensiereinrichtung, vorzugsweise gleichzeitig oder in geringem zeitlichen Abstand,

Zweite Phase: Elektrische Injektion durch gleichzeitiges Befüllen aller Kreuzungspunkte zwischen dem Injektionskanal und den Trennkanälen unter Wirkung eines elektrischen Feldes mit anschließender eventueller Aufkonzentrierung an dafür speziell vorgesehenen Zonen, und

Dritte Phase: Parallele Trennung aller Proben in den Trennkanälen.

Nach der Detektion der Analyt-Bestandteile in der Detektionszone D (Ende der elektrophoretischen Trennung) kann der Trägerchip C der Elektrophoresekammer A entnommen und entsorgt werden. Die Elektrophoresekammer K steht für die nächste Trennung mit einem neuen Trägerchip C zur Verfügung.

Der beschriebene Ablauf ist vollständig automatisierbar. Geeignete Stelleinrichtungen setzen den Trägerchip C in die Elektrophoresekammer und positionieren den oder die Mikrodispenser an den Auftragsbereichen A. Die Stelleinrichtung kann mit einer Bildaufnahmeeinrichtung zur erleichterten Positionierung der Mikrodispenser in Bezug auf den Trägerchip C ausgestattet sein.

PATENTANSPRÜCHE

1. Elektrophoresevorrichtung mit einer Vielzahl von separat mit Proben beschickbaren Trennkanälen (S), die jeweils mit einem Probenkanal verbunden sind, von dem unter elektrischer Feldwirkung Proben in den jeweiligen Trennkanal injizierbar sind,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Probenkanäle miteinander verbunden sind, so daß ein gemeinsamer Injektionskanal (I) gebildet wird, der an seinen Enden Elektroden (E3, E4) zur Erzeugung der elektrischen Feldwirkung aufweist.

2. Elektrophoresevorrichtung gemäß Anspruch 1, bei der der Injektionskanal (I) an jeden Trennkanal (S) angrenzend, auf einer vorbestimmten Seite des jeweiligen Kreuzungspunktes einen Auftragsbereich (A) besitzt, der zur Probenaufnahme mit einem Mikrodispenser eingerichtet ist.

3. Elektrophoresevorrichtung gemäß Anspruch 2, bei der der Injektionskanal (I) an den Auftragsbereichen (A) jeweils Kanalerweiterungen besitzt.

4. Elektrophoresevorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der der Injektionskanal (I) für jeden Trennkanal auf der dem jeweiligen Auftragsbereich (A) gegenüberliegenden Seite des jeweiligen Kreuzungspunktes eine Molekülfalle (M) aufweist.

5. Elektrophoresevorrichtung gemäß Anspruch 4, bei der die Molekülfalle (M) eine Kanalerweiterung, eine semipermeable Membran oder eine dreidimensionale, poröse Struktur ist.

6. Elektrophoresevorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Trennkanäle (S) und der Injektionskanal (I) auf einem Trägerchip (C) ausgebildet sind, der Teil einer Elektrophoresekammer (K) mit Pufferreservoiren (P1, P2) jeweils mit einer Elektrode (E1 bzw. E2) ist.

7. Elektrophoresevorrichtung gemäß Anspruch 6, bei der der Trägerchip (C) zur Einwegbenutzung eingerichtet und von der Elektrophoresekammer (K) lösbar ist.

8. Elektrophoresevorrichtung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, die Teil einer Analyseeinrichtung ist, die mindestens einen Mikrodispenser zur Probenzuführung in die Auftragsbereiche (A) des Injektionskanals (I) aufweist.

9. Verfahren zum Einsatz einer Elektrophoreseeinrichtung mit miniaturisierten Trennkanälen (S), die jeweils mit einem Probenkanal verbunden sind, von dem unter elektrischer Feldwirkung Proben in den jeweiligen Trennkanal injizierbar sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß
die Probenbeschickung der Probenkanäle mit einem Mikrodispenser erfolgt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, bei dem die Probenkanäle zu einem Injektionskanal (I) einer Elektrophoresevorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1-8 zusammengefaßt sind.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, bei dem zur Probentrennung die Proben in den Injektionskanal (I) in der Nähe der Kreuzungspunkte zwischen dem Injektionskanal (I) und jeweils einem Trennkanal (S) eingebracht und unter Wirkung eines elek-

trischen Feldes im Injektionskanal in den Trennkanal überführt werden, wo die elektrophoretische Trennung erfolgt.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, bei dem die Proben vor der Trennung in vorbestimmten Zonen am Beginn des Trennkanals elektrisch aufkonzentriert werden.

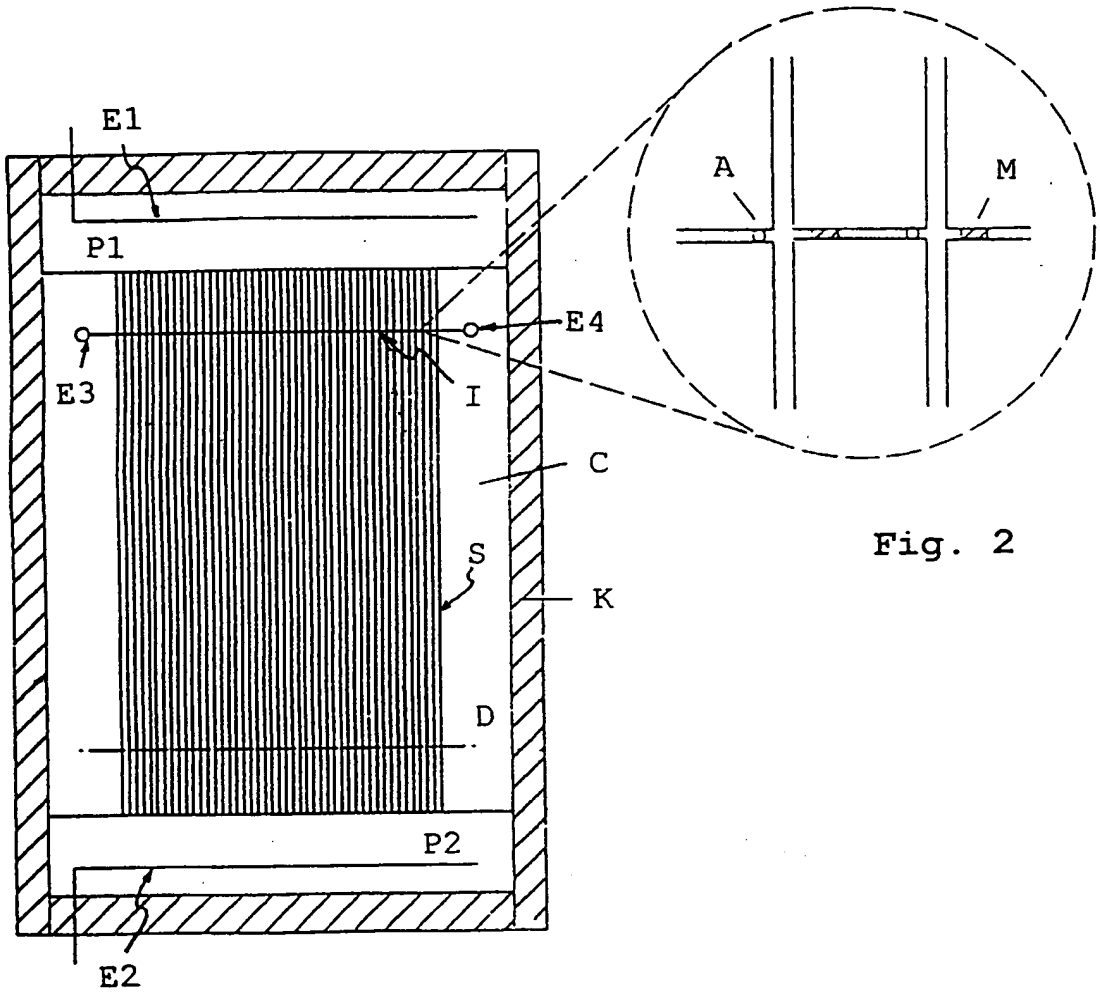


Fig. 2

Fig. 1

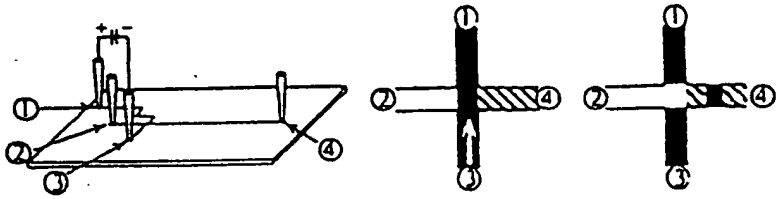


Fig. 3
(Stand der Technik)

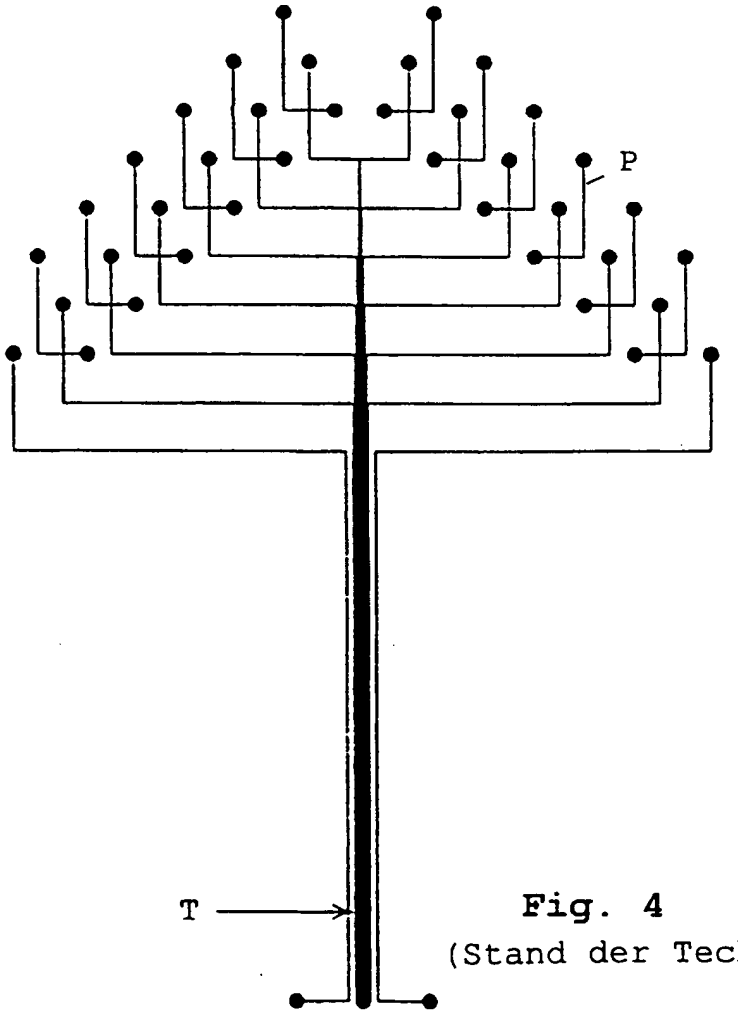


Fig. 4
(Stand der Technik)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte· ·ional Application No
PCI/EP 99/03834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N27/447

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 98 04909 A (SOANE BIOSCIENCES) 5 February 1998 (1998-02-05) page 26, line 17 - line 28; figure 18 ---	1,9
Y	EVANS C E: "DIRECT ON-LINE INJECTION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, no. 15, 1 August 1997 (1997-08-01), pages 2952-2954, XP000699461 ISSN: 0003-2700 abstract; figure 1 ---	1,9
A	DE 41 39 211 A (HITACHI LTD) 4 June 1992 (1992-06-04) abstract; figure 1 ---	1
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 September 1999	28/09/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Duchatellier, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/03834

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 34138 A (UNIV WASHINGTON ;WILSON RICHARD K (US); MARDIS ELAINE R (US); PANU) 18 September 1997 (1997-09-18) abstract; figure 1	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte tional Application No
PCT/EP 99/03834

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9804909 A	05-02-1998	US 5770029 A	23-06-1998
		AU 3968097 A	20-02-1998
DE 4139211 A	04-06-1992	JP 5093711 A	16-04-1993
		US 5192412 A	09-03-1993
WO 9734138 A	18-09-1997	US 5849598 A	15-12-1998
		AU 2325297 A	01-10-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03834

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 98 04909 A (SOANE BIOSCIENCES) 5. Februar 1998 (1998-02-05) Seite 26, Zeile 17 - Zeile 28; Abbildung 18 ---	1,9
Y	EVANS C E: "DIRECT ON-LINE INJECTION IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS" ANALYTICAL CHEMISTRY. Bd. 69, Nr. 15, 1. August 1997 (1997-08-01). Seiten 2952-2954, XP000699461 ISSN: 0003-2700 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1,9
A	DE 41 39 211 A (HITACHI LTD) 4. Juni 1992 (1992-06-04) Zusammenfassung; Abbildung 1 --- -/--	1

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
22. September 1999	28/09/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Duchatellier, M

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/03834

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 34138 A (UNIV WASHINGTON ;WILSON RICHARD K (US); MARDIS ELAINE R (US); PANU) 18. September 1997 (1997-09-18) Zusammenfassung; Abbildung 1	9

2